

Korean Journal of Obstetrics and Gynecology
Vol. 48 No. 6 June 2005

산발성 난소암에서의 BRCA1과 BRCA2의 배선 유전자 돌연변이와 유전자다형성

남은지·김영태·김성훈·김재훈·구자성·김상운·김재욱·김현기*

Germline Mutations and polymorphisms of BRCA1 and BRCA2 in Sporadic Ovarian Carcinoma

Eun Ji Nam, M.D., Young Tae Kim, M.D., Sung Hoon Kim, M.D., Jae Hoon Kim, M.D.,
Ja Seong Koo, M.D., Sang Woon Kim, M.D., Jae Wook Kim, M.D., Hyun Ki Kim, M.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Women's Life Science,

**Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective: Mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes predispose women to ovarian and/or breast cancer. The purposes of this study were firstly to investigate the presence of BRCA1 and BRCA2 mutations in women with non-hereditary ovarian cancer and secondly to evaluate the relationship between ovarian cancer susceptibility gene polymorphism and clinicopathological features.

Methods: We studied 37 women who received a diagnosis of sporadic ovarian epithelial cancer and were treated at our hospital between August 2002 and March 2004. Genomic DNA was analyzed for BRCA mutations using PCR-DHPLC-sequencing method. And we examined the relationship between ovarian cancer susceptibility gene polymorphism and clinicopathological features using a high-throughput SNP scoring methods.

Results: Most mutations of BRCA1 and BRCA2 associated with ovarian and/or breast cancer resulted in truncated proteins. We found one frameshift mutation in BRCA1 (3746insA) led to premature termination. She has no family history of breast and ovarian cancer. There was no relationship between ovarian cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features.

Conclusion: Our results were consistent with the concept that there was a limited role of BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian carcinogenesis in Korean population and polymorphisms of some selected ovarian cancer susceptibility genes were not associated with the clinicopathological phenotypes of ovarian cancer.

Key Words: BRCA1, BRCA2, Germline mutation, Sporadic ovarian carcinoma, Polymorphism

서론

난소암은 한국에서 자궁경부암에 이어 두 번째로 흔

한 부인암으로 여성암 사망의 주요 원인 질환이다. 매년 900여명 이상의 새로운 환자가 발생하고 있으며 국내에서는 최근 10년간 난소암의 발생률이 점차 증가하는 양상을 보이고 있다. 그러나, 난소암이 상당히 진전될 때까지 증상이 발현되지 않는 경우가 많고 아직까지 적절한 선별검사 방법이 없어 현실적으로 조기 진단에 어려움이 많다. 그러므로 난소암을 예방하거나 생존율을 향상시키기 위해 난소암의 발생 위험 인자에 대한 포괄적

접수일 : 2004. 2. 23.

주관책임자 : 김영태

E-mail: ytkchoi@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 2005년도 한국여성암 연구재단의 연구비 지원을 받아 수행되었음.

인 연구는 매우 중요하다.

난소암의 발생 원인은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 환경, 생식력, 유전학적인 인자들이 주요 원인으로 거론되고 있지만 최근 분자 생물학적인 연구들의 결과 점차 유전학적인 측면이 강조되고 있다. 난소암이 어떤 가족에서 집단적으로 발생한다는 사실이 오래 전부터 관찰되어 난소암과 가족력간에 밀접한 관계가 있음이 잘 알려져 있어 왔다. 직계 가족 중 유방암이나 난소암 환자가 있는 여성은 유방암이나 난소암에 걸릴 상대 위험도가 2-3배 증가하며 그 역도 성립함이 보고되는 등 유방암과 난소암에 동시에 작용하는 어떤 유전자가 존재함이 시사되었다.¹

1994년 Miki 등에 의해 Breast Cancer Gene 1 (BRCA1), 1995년 Wooster에 의해 Breast Cancer Gene 2 (BRCA2)가 가족성 유방암/난소암의 발생과 연관성이 높음이 발표된 이후 수많은 연구자들이 이들 유전자에 대해 연구해왔다.^{2,3} BRCA1 유전자의 변이가 있는 경우 60세까지 유방암과 난소암이 발병될 가능성은 각각 54%, 30%인 것으로 보고되었다.⁴ 난소암 환자에서 유전자 돌연변이가 관찰되는 비율은 인종간에 편차가 있으나 1980년대 후반에 발표된 분리분석 연구 (segregation analysis studies)에 의하면 5%에서 10%정도의 유방암/난소암 환자가 보통염색체우성유전 (autosomal dominant) 양상의 유전자 돌연변이로 인해 암이 발생하는 것으로 보고되었다.^{5,6} BRCA1은 염색체 17q12-q21에 위치하며, 전체 24개의 엑손 (exon)이 약 100 kb의 지놈 DNA (genome DNA)에 걸쳐 분포하고 있으며 이 중 22개의 엑손이 1,863개의 아미노산을 암호화하고 있다. BRCA1 유전자의 기능은 아직 잘 알려져 있지 않지만 종양억제 유전자의 역할을 수행하거나 전사조절 유전자 기능을 하는 것으로 추측된다.² BRCA2는 retinoblastoma (RB) 유전자 (gene)의 근위 부인 염색체 13q12-q13에 위치하며, 전체 27개의 엑손이 3,418개의 아미노산을 암호화하고 있다.³ 가족성 난소암에서 현재까지 다수의 BRCA1 및 BRCA2배선 유전자 돌연변이가 발견되어 난소암 발생에 중대한 역할을 담당할 것으로 보고되었다. 한편, first degree나

second degree의 친족 중 난소암이나 유방암 환자가 없는 산발성 난소암 (sporadic ovarian cancer)에서도 BRCA유전자 돌연변이가 연구되어 Futreal 등은 산발성 난소암에서의 BRCA1 배선 유전자 돌연변이를 발견하여 보고한 바 있어 산발성 난소암에서도 BRCA 유전자 돌연변이가 역할을 할 것으로 추정된다.⁷ 난소암 및 유방암의 발생과 연관된 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 돌연변이는 유전자 조절부위 상에 프레임 이동 (frameshift), 난센스 (nonsense), 스프라이스 (splice) 등의 돌연변이여서 돌연변이 된 유전자는 절단 단백질 (truncated protein)을 생산하게 되거나 생산된 단백질의 기능 부전을 초래하게 된다.³ 세계 각지에서 이루어진 연구들에 의하면, BRCA1 및 BRCA2 유전자의 돌연변이율 및 특징은 인종마다 차이가 커서 어떤 돌연변이는 특정 인종에게서 특징적으로 나타나기도 한다.⁸ 현재까지 BRCA 1 및 BRCA2 유전자 돌연변이에 대한 연구는 주로 구미에서 백인 (Caucasian)을 대상으로 집중적으로 이루어졌으나 일본이나 홍콩에서도 소규모 연구가 진행되어 이들 인종에 특이한 BRCA 1 및 2의 유전자 돌연변이가 보고되기도 하였다. 한국에서는 1995년도부터 한 연구진에 의하여 가족성 유방암/난소암 가족에서 BRCA1 유전자 돌연변이에 대해 보고되었으나⁹⁻¹² 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자를 대상으로 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이를 연구하고 BRCA 유전자 돌연변이가 난소암 발생에 기여하는 정도를 조사한 연구는 현재까지 전무한 실정이다.

기존의 연구보고들에서 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이율을 살펴보면, 가족성 유방암/난소암 가족에서 BRCA1 유전자 배선 돌연변이율은 18-67%였고, BRCA2 유전자 배선 돌연변이율은 14-15% 이었다.¹²⁻¹⁵ 반면에 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자에서 BRCA1 및 BRCA2유전자의 배선 돌연변이율은 가족성 난소암환자군에 비해 낮게 보고되었다.¹⁶⁻²¹ 이처럼 기존 연구에서 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암에서 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 배선 돌연변이율이 낮다는 것은 난소암 발생에 영향을 미칠 수 있는 낮은 발현도 (penetrance)를 갖는 유전자들이 존

재할 수 있음을 시사한다.²² 최근 유전자 데이터베이스가 급격히 확장되고 기술의 발달로 단시간에 자동적으로 많은 (high-throughput) 유전형 분석 (genotyping)을 시행할 수 있게 되어 유방암과 같은 영역에서 유전자 다형성 (polymorphism), 특히 단일염기다형성 (single-nucleotide polymorphism, SNP)과 암발생 및 임상병리학적 특징의 연관성을 찾는 연구들이 시행되었고, 유전자 다형성은 암발생 (development) 및 진행 (progression)에 영향을 미칠 뿐만 아니라 결과적으로 암의 표현형 (phenotype) 및 예후 (prognosis)와도 연관이 있을 수 있음이 보고되었다.²³⁻²⁵

이에 저자들은 본 연구에서 한국인에서 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자의 BRCA1 및 BRCA2의 배선 유전자 돌연변이가 있는지를 연구하고 발생을 구하였으며 이와 아울러 난소암 발생과 연관된 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 다형성 (polymorphism)이 난소암의 임상병리학적인 특징과 연관성이 있는지 규명하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 대상환자

2002년 8월부터 2004년 3월까지 병기 결정을 위한 개복술을 시행 받고 조직병리학적으로 난소암을 확진 받은 37명을 대상으로 말초 혈액 및 신선 조직을 채취하여 분석 대상으로 하였다. 대상 환자들의 first degree나 second degree의 친족 중 난소암이나 유방암 환자는 없었다.

2. 방법

1) PCR amplification

EDTA-whole blood 검체로부터 genomic DNA를 Kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, USA) protocol에 따라 분리하였다. BRCA1과 BRCA2의 배선 돌연변이 (germline mutation)을 확인하기 위하여

BRCA1 33개, BRCA2 48개의 primer를 이용하여 전체 51 exon을 모두 증폭하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 10 Mm Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 uM dNTP, 1 uM of each primer, 0.5 units of Taq polymerase (Promega, USA), and 1X concentration of PCR buffer, in a total volume of 25 ul, 1 cycle 94°C 5 min, 34 cycle 94°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 45 sec and 1 cycle 72°C 3 min. Applied Biosystems GeneAmp 2700 PCR machine을 사용하였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel에 loading한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 전체 81개의 primer 염기 서열은 참고문헌²⁶⁻²⁸을 참조하였다.

2) DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

DHPLC 장치는 제조사 (WAVE: Transgenomic, San Jose, CA, USA) protocol에 따라 running하였다. 15 ul PCR product를 95°C에서 5분 동안 denature 시킨 후, 약 40분 동안 55°C까지 천천히 온도를 낮추어 rennealing 시킨다. 이 product중 5-8 ul를 DHPLC 장치에 사용하며 분석은 약 7-12분이 소요된다. The column mobile phase는 0.1 M triethylamine acetate (pH 7.0) with (buffer B) or without (Buffer A) 25% acetonitrile의 혼합으로 이루어져 있으며 각 product에 대한 분석 gradient는 제조사의 WAVEmaker system control software (Transgenomic, San Jose, CA, USA)에 의해 자동으로 결정된다. Product의 elution 상태는 chromatogram으로 computer monitor에 나타나며 일반적으로 heterogenous molecules는 homozygous molecules peak 앞에 하나의 peak가 더 나타나며 homozygous molecules는 하나의 peak만 나타난다.

3) Sequence Analysis

비정상적인 peak pattern을 보이는 PCR product는 Kit (QIAquick PCR purification Kit QIAGEN, USA) protocol에 따라 분리하였으며 양방향 염기서열 분석을

위해 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI 3100 Genetic Analyzer를 이용하였다. BRCA1 및 BRCA2 유전자의 주조직 적합항원염색체 (haplotype)은 Breast Cancer Information Core (BIC): http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/로부터 구성하였다.

4) DNA 유세포분석법

DNA 유세포분석을 위해 일차적 개복술을 통해 얻은 신선조직 (fresh tissue)을 이용하였다. 검체는 0.2 g의 조직을 -70°C 에서 냉장보관하였고, Vindelov's technique을 이용하여 검체를 고정하였으며 각각 25,000개의 세포를 검사하였다.^{21,22} DNA 배수성 및 합성기 분율은 Phenix flow system을 통해 산출되었다. DNA histogram 상에서 서로 다른 G0/G1 peak가 2개 이상 나타나며 peak를 구성하는 세포의 최소 10%

가 aneuploid cells일 때를 비배수성으로 정의하였다. 변이계수 (coefficient of variation)는 5% 이내인 histogram을 적합한 것으로 판정하였다. DNA index (DI) 값은 정상조직의 DNA 함량에 대한 검체조직의 DNA 함량의 비로 0.96–1.04일 때를 이배수성으로 정의하였고 이 기준에서 제외되는 검체는 비배수성으로 정의하였다.

5) 통계분석

PCR–DHPLC–sequencing method로 BRCA1 및 BRCA2 유전자형 분석 (genotyping)을 하는 중 총 32개의 염기다형성 (polymorphisms)를 얻었다. 이렇게 얻어진 다형성 대립유전자 (polymorphic alleles)와 난소암의 임상병리학적인 특성과의 분석은 SPSS version 11.0 software를 사용하여 Fisher's exact test로 분석하였다.

Table 1. Characteristics of patients with ovarian cancer

	n	%
Age		
Median (years, range)	44	(18-72)
<35	7	18.9
≥35	30	81.1
Histology		
Serous cystadenocarcinoma	21	56.8
Mucinous cystadenocarcinoma	6	16.2
Clear cell carcinoma	3	8.1
Endometrioid carcinoma	3	8.1
Squamous cell carcinoma	2	5.4
Adenocarcinoma, non specific	2	5.4
Histologic grade		
I-II	9	32.1
III	19	67.9
Stage		
I	8	21.6
II	4	10.8
III	24	64.9
IV	1	2.7
DNA ploidy		
Diploidy	11	44.0
Aneuploidy	14	56.0

결 과

1. 대상 환자의 특성

대상 환자의 37명의 연령 범위는 18세에서 72세였으며 연령중앙값 (median age)는 44세 이었고 평균 연령은 47.7세 이었다. FIGO 병기 (stage)에 따르면 I기는 8명 (21.6%), II기는 4명 (10.8%), III기는 24명 (64.9%), IV기는 1명 (2.7%)이었다. 조직병리학적 유형별 분포는 장액성 (serous) 난소암 21명 (56.8%), 점액성 (mucinous) 난소암 6명 (16.2%), 투명세포 (clear cell type) 난소암 3명 (8.1%), 자궁내막양 (endometrioid) 난소암 3명 (8.1%), 편평세포 (squamous cell type) 난소암 2명 (5.4%), 기타 미분화 난소암은 2명 (5.4%)이었으며 조직학적 분화도 (grade)검사가 이루어진 28명 중에 19명 (67.9%)이 grade 3에 해당되었다. 25명의 환자에서 종양 조직의 DNA 유세포분석 (flow cytometry) 검사를 시행한 결과 11예는 이배수성 (diploidy) 갖았고 14예는 비배수성 (aneuploidy)를 갖는 것으로 확인되었다 (Table 1).

2. PCR-DHPLC-Sequencing 결과

한국인에서 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자 37명을 대상으로 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 돌연변이를 찾아내기 위한 PCR-DHPLC-Sequencing을 유전자 전체 exon에서 수행하여 그 중 1명의 난소암 환자에서 프레임 이동 (frame shift) 돌연변이가 발견되었다. 돌연변이는 BRCA1 유전자의 엑손 11K에 있는 코돈 1,218에서 3,746번째 염기에 adenine이 삽입 (insertion)되어 그 결과 프레임이 이동하여 코돈 1,218에 정지 (stop) 코돈이 형성되어 절단 단백질 (truncated protein)을 생성하게 된다 (Fig. 1). 전체 환자 중 BRCA1 유전자 돌연변이율은 2.7%에 해당하였다. 37명의 난소암 환자의 BRCA2 유전자에서는 돌연변이가 발견되지 않았다. BRCA1 유전자 돌연변이가 확인된 환자는 49세 여환으로 가족력상 유방암이나 난소암

의 가족력은 없었다.

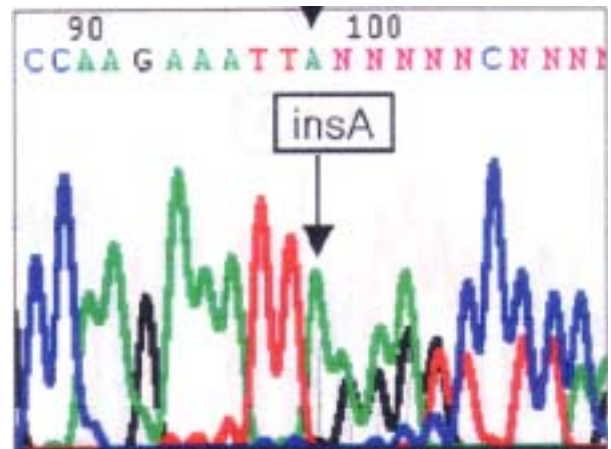


Fig. 1. Germline mutation of BRCA1 gene in clear cell ovarian cancer patient. Arrow indicates abnormally shifted DNA bands due to adenine insertion in nucleotide sequences of exon 11K of BRCA1 gene, which leads to frame shift change in translation and immature chain termination of BRCA1 protein.

3. 단일염기다형성 (SNP)와 대상 환자의 임상병리학적 특성의 연관성 분석

PCR-DHPLC-sequencing method로 BRCA1 및 BRCA2 유전자형 분석 (genotyping)을 하는 중 얻어진 총 32개의 염기다형성 (polymorphisms)중에 연구 대상 환자로부터 대립인자빈도가 좀더 적은 쪽이 (rare allele frequency) 10% 이상인 염기다형성 5개를 선택하였다 (Table 2). BRCA1 유전자에서는 Ser694Ser, Leu771Leu, Pro871Leu이, BRCA2 유전자에서는 His-372Asn, Ser2412Ser의 rare allele frequencies가 10% 넘었으며, 이들 대립 유전자의 빈도는 거의 Hardy-Weinberg equilibrium을 만족시켰다. 이들 중 Pro-871Leu, His372Asn는 단백질의 변화를 초래하였고, 모든 SNP들은 각 유전자들의 코드화 지역 (coding region)에 위치하였다. 이렇게 얻어진 5개의 BRCA1 및 2 유전자의 염기다형성을 난소암의 임상병리학적 특징 (발생 연령, 가족력, 병기, 조직학적 분화도, DNA 유세포분석 결과)과 비교하였으나 유의성 있는 차이를 보이는 결과는 없었다 (Table 3).

Table 2. Gene list and genotype frequencies

Gene	Variations	n	Common	Heterozygotes N (%)	Rare Homozygotes N (%)	Rare Allele Frequency
			Homozygotes N (%)			
BRCA1	Ser694Ser C2201T	7	30 (81)	7 (19)	0	0.10
	Leu771Leu T2430C	14	23 (63)	14 (37)	0	0.19
	Pro871Leu C2731T	15	22 (57)	15 (43)	0	0.21
BRCA2	His372Asn C1342A	21	16 (43)	13 (35)	8 (21)	0.39
	Ser2412Ser A7470G	9	28 (76)	9 (24)	0	0.12

Table 3. Association of variants of polymorphism with clinicopathological features of ovarian cancer

Characteristics		n	N (%)				
			C2201T	BRCA1 T2430C	C2731T	BRCA2 C1342A	A7470G
Age	≥ 35 yrs	30	5 (16)	11 (36)	11 (36)	12 (40)	6 (20)
	< 35 yrs	7	1 (14)	2 (28)	3 (42)	3 (42)	1 (14)
Family history	No	35	5 (14)	11 (32)	12 (35)	13 (38)	6 (17)
	Yes	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
Histologic grade	I or II	8	0 (0)	3 (37)	4 (50)	3 (37)	1 (12)
	III	19	5 (26)	7 (36)	8 (42)	8 (42)	5 (26)
Surgical stage	I	8	0 (0)	3 (37)	4 (50)	4 (50)	1 (12)
	II-IV	28	6 (21)	11 (39)	11 (39)	11 (39)	6 (21)
DNA flow	Diploidy	11	3 (27)	5 (36)	6 (54)	7 (63)	4 (36)
Cytometry	Aneuploidy	14	2 (14)	6 (42)	6 (42)	5 (35)	1 (7)

고 찰

BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이는 가족성 난소암 및 유방암의 발생에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 여겨지며^{1,2,29} 산발적으로 발생된 난소암, 유방암에서도 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이가 발견되었다.^{16,17} BRCA1 유전자 돌연변이는 현재까지 500여 종류가 보고되었으며 전체 유전자의 62% 가량을 차지하는 엑손 11번에서 55%의 돌연변이가 발견되었다.³⁰ BRCA2 유전자 돌연변이는 현재까지 300여 종류 이상이 보고되었고 흥미롭게도 BRCA1 유전자처럼 엑손 11번의 크기가 크지만 특별히 유전자상에 돌연변이가 호발하는 부분

(hot spots)은 존재하지 않는다. BRCA1 및 BRCA2 유전자의 전체 돌연변이 중 80%가 프레임 이동 (frame shift), 난센스 (nonsense), 과오 (missense), 스프라이스 (splice), 조절부위 (regulatory) 돌연변이이므로 이들 유전자는 절단 단백질 (truncated protein)을 생산하게 된다. 이와 같은 사실은 절단 단백질 검사법 (protein truncation assay)과 같은 간단한 난소암 선별 검사 방법의 가능성을 암시한다. 그러나 아직까지 절단 단백질의 생물학적 활성 유무, 세포내의 위치, 우성 음성효과 (dominant negative effect), 조절기능의 상실 여부 등에 대하여는 확실히 알려진 바가 없다.

또한 BRCA1 유전자의 돌연변이에 따른 유전자형과

표현형 사이의 관계는 아직 잘 알려져 있지 않지만 Johansson 등은 C-말단 부위의 돌연변이로 인하여 전체 BRCA1 단백질 중 8% 미만이 소실된 경우는 특히 장기특이성 유방암 가계에서 흔히 발견된다고 보고하였고¹⁵ Gayther 등도 C-말단 1/3내에 위치한 BRCA1 돌연변이는 난소암의 발생빈도가 낮다고 보고하였다.¹⁴ 현재까지 외국의 보고에 의하면 BRCA1과 연관된 가족성 유방암/난소암 환자들 중 약 1/3 내지 2/3 환자에서 BRCA1 유전자의 배선 돌연변이를 발견할 수 있었고, BRCA2 유전자의 배선 돌연변이는 10% 내외에서 발견되었다.¹²⁻¹⁵ 반면에 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자에서 BRCA1 유전자의 배선 돌연변이율은 1.4-13.3%였고, BRCA2 유전자의 배선 돌연변이율은 0.9-8.0% 이었다 (Table 4,5).^{16-21,31,32} 본 연구의 경우 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자 중 BRCA1 유전자의 배선 돌연변이율은 2.7%로 외국 연구에 비해 약간 낮은 정도였으나 BRCA2 유전자의 배선 돌연변이는 발견하지 못하였다. 따라서 난소암 발생

에 있어 인종 차이 (racial difference)가 존재할 것으로 생각되며 백인 (Caucasion)에 비해 한국인에서 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 배선 돌연변이가 난소암 발생에 제한된 역할만을 수행한다고 사료된다.

Whittemore 등의 보고 따르면 BRCA1 또는 BRCA2 유전자 돌연변이를 가진 보인자가 80세까지 살 경우 유방암 또는 난소암에 이환될 확률 (lifetime risk)은 BRCA1 유전자 돌연변이 보인자의 경우 73.5%, BRCA2 유전자 돌연변이 보인자의 경우 27.8%로 알려져 있다.³³ 그러나, 유전학적으로 난소암 또는 유방암에 이환될 수 있는 고위험군에 속한 환자들을 선별방법 (screening method)으로 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이 검사는 실험실 수준을 넘어 일반화시키기는 무리가 있다. 첫째로 난소암 환자를 대상으로 시행한 본 연구에서 서구보다 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 돌연변이율이 낮게 나타났을 뿐 아니라 돌연변이가 발견된 환자의 경우 난소암이나 유방암의 가족력이 없었고, 둘째, BRCA1 및 BRCA2 유전자가 불완전한 투과도

Table 4. BRCA mutation incidence among ovarian cancer unselected for family history

Reference	Year	No. of patients	BRCA1	BRCA2
			(%)	(%)
Takahashi et al ^{17,21}	1995/1996	115/130	6.1	3.1
Foster et al ²⁰	1996	50	-	8.0
Stratton et al ¹⁸	1997	374	3.5	-
Risch et al ¹⁹	2001	515	7.6	4.1
Khoo et al ³¹	2002	214	1.4	0.9
Liede et al ³²	2002	120	13.3	2.5

Table 5. Germline BRCA mutation incidence among breast and ovarian cancer families

Reference	Year	No. of families	BRCA1	BRCA2
			(%)	(%)
Gayther et al ¹⁴	1995	32	53	-
Johansson et al ¹⁵	1996	15	67	-
Kang et al ¹²	2002	21	18	14
Reedy et al ¹³	2002	26	30	15

(incomplete penetrance)를 갖기 때문에 비록 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이가 있어도 난소암 또는 유방암에 이환되지 않는 경우도 있고 셋째, 검사상 비용 효과적인 면이 아직 평가되지 않았으며 넷째, 검사상 위양성 및 위음성 문제가 있으며 다섯째, BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이가 발견되었다 해도 고위험군에 속한 환자들의 치료방침은 아직 결정된 것이 없고 예방적 난소절제술 등^{34,35}의 치료방법을 사용하더라도 원발성 복막암 (primary peritoneal carcinoma)의 발생을 완전히 막을 수 없다는 점을 들 수 있다.

높은 투과도 (penetrance)를 갖는 BRCA1 또는 BRCA2 유전자 돌연변이가 난소암 발생의 원인이 되는 사실은 이미 많은 연구에 의해서 확인되었다. 하지만 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이는 일반인에서는 그 빈도가 매우 낮다 ($<0.5\%$, 백인여성).⁸ 따라서 난소암 발생에 영향을 미칠 수 있는 낮은 투과도를 갖는 유전자들이 존재할 수 있음이 시사되었고, BRCA1 및 BRCA2 유전자의 염기서열다형성은 이를 밝혀내고자 하는 연구의 후보 대상이 되었다.

유전자 다형성은 전사 산물인 단백질의 기능 및 발현에 영향을 미쳐 암 발생 및 그 표현형에 영향을 미칠 수 있다. 현재까지 드문 대립유전자 빈도 (rare allele frequencies)가 많은 수의 인구를 대상으로 시행했을 때 5% 이상 존재하는 것으로 밝혀진 염기서열다형성들은 BRCA1 유전자에서는 Q356R, P871L, E1038G, K1183R, S1613G 5가지가 있고,³⁶ BRCA2 유전자에서는 N372H가 발견되었다.³⁷ 몇몇 연구에서는 이러한 유전자다형성들이 유방암 및 난소암의 발생을 증가시킨다는 보고도 있었고,³⁶ HH 동형접합체 (homologue)의 경우 난소암에서 장액성 (serous)유형이 더 많은 경향이 있다는 보고도 있었다.³⁸ 하지만, 이에 반해 BRCA1 및 2의 유전자다형성이 난소암 발생을 증가시키지 않는다는 보고³⁹도 있어 아직 유전자다형성의 역할에 대한 연구는 논쟁 중이다. 본 연구에서도 BRCA1의 P871L, BRCA2의 N372H의 경우 rare allele frequency가 10%가 넘게 나타나 이들 연구와 일치된 결과를 보였다. 하지만 주로 백인을 대상으로 한 연구보고들에서는

N372H 중 NN homologue가 52–54% 이상을 차지하고, HH homologue는 5–6%를 차지한데 반해,^{37–39} 우리 연구에서는 HH homologue가 43%, NN homologue가 21%를 차지해 위 연구들과 차이를 보였다. 백인을 대상으로 한 연구에서는 정상인을 대조군에 포함해 유전자다형성 빈도를 측정하였고 유전인자 간의 연관불균형 (linkage disequilibrium)을 고려하여 구조적적합한 원염색체 (haplotype)의 빈도를 측정한 것도 있어 우리 연구와 차이를 보였다고 하겠다. 그러나 우리 연구에서 HH homologue의 비율이 NN homologue 보다 높다는 결과는 유전자 다형성의 빈도에 인종 차이 (racial difference)가 존재함을 반영한다고 하겠다. 우리는 BRCA1 및 BRCA2 유전자를 direct sequencing하여 얻어진 SNP와 난소암의 임상 병리학적인 특징과의 연관성을 분석하고자 하였으나 본 연구에서는 통계적으로 의미 있는 결과를 얻지 못하였다.

결론적으로 저자들은 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자에서 BRCA1 유전자의 배선 돌연변이는 2.7%에서 관찰하였으며 이는 기존 보고들에서 발표된 산발성 난소암 환자를 대상으로 BRCA1 배선 돌연변이율과 유사하였다. 그러나 BRCA2 유전자 배선 돌연변이는 발견하지 못하였으며 난소암 발생에 감수성을 가진 BRCA1 및 BRCA2의 유전자 다형성과 난소암의 임상병리학적 특징과의 상관관계를 발견하지 못하였다. 따라서 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 배선 돌연변이 및 다형성은 한국인에서 난소암 발생에 제한된 역할 (limited role)만을 하고 있다고 사료된다.

참고 문헌

1. Houlston RS, Collins A, Slack J, Campbell S, Collins WP, Whitehead MI, et al. Genetic epidemiology of ovarian cancer: segregation analysis. *Am Hum Genet* 1991; 55: 291–9.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66–71.
3. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789–92.
4. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage

- analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678-701.
5. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: Evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3044-8.
6. Schildkraut JM, Risch N, Thompson WD. Evaluating genetic association among ovarian, breast, and endometrial cancer: Evidence for a breast/ovarian cancer relationship. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 521-9.
7. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994; 266: 120-2.
8. Szabo CI, King MC. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1013-20.
9. Oh JH, Noh DY, Choe KJ, Kang SB, Kim LS, Ro MS, et al. Germline mutation of BRCA1 gene in Korean breast and ovarian cancer patients. *J Korean Cancer Res Assoc* 1995; 27: 1061-9.
10. Won YJ, Oh JH, Huang XH, Noh DY, Choe KJ, Kang SB, et al. Germline mutations of BRCA1 gene in Korean breast and/or ovarian cancer families. *J Korean Cancer Assoc* 1997; 29: 713-23.
11. Won YJ, Oh JH, Kim JH, Noh DY, Choe KJ, Kang SB, et al. Germline mutations of BRCA2 gene in Korean breast and/or ovarian cancer families. *J Korean Cancer Assoc* 1998; 30: 242-52.
12. Kang HC, Kim IJ, Park JH, Kwon HJ, Won YJ, Heo SC, et al. Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean breast and/or ovarian cancer families. *Hum Mutation* 2002; 20: 235-9.
13. Reedy M, Gallion H, Fowler JM, Kryscio R, Smith SA. Contribution of BRCA1 and BRCA2 to familial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 255-9.
14. Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, Russell PA, Harrington PA, Chiano M, et al. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet* 1995; 11: 428-33.
15. Johansson O, Ostermeyers EA, Hakansson S, Friedman LS, Johansson U, Sellberg G, et al. Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 441-50.
16. Matsushima M, Kobayashi K, Emi M, Saito H, Saito J, Suzumori K, et al. Mutation analysis of the BRCA1 gene in 76 Japanese ovarian cancer patients: four germline mutations, but no evidence of somatic mutation. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1953-6.
17. Takahashi H, Behbakht K, McGovern PE, Chiu HC, Couch FJ, Weber BL, et al. Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 2998-3002.
18. Stratton JF, Gayther SA, Russell P, Dearden J, Gore M, Blake P, et al. Contribution of BRCA1 mutations to ovarian cancer. *N Engl J Med* 1997; 336: 1125-30.
19. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 700-10.
20. Foster KA, Harrington P, Kerr J, Russell P, DiCioccio RA, Scott IV, et al. Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 3622-5.
21. Takahashi H, Chiu HC, Bandera CA, Behbakht K, Liu PC, Couch FJ, et al. Mutation of the BRCA2 gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 2738-41.
22. Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BA, et al. Effect of germline genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res* 2002; 62: 3052-7.
23. Sjalander A, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L, et al. p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1313-6.
24. Powell BL, van Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip 1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 311-5.
25. Han WS, Kang DH, Park IA, Kim SW, Bae JY, Noh DY, et al. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 124-30.
26. Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M. A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat* 1999; 14: 333-9.
27. Wagner TM, Hirtenlehner K, Shen P, Moeslinger R, Muhr D, Fleischmann E, et al. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 413-23.
28. Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 1999; 62: 369-76.
29. Lynch HT, Casey MJ, Lynch J, White TE, Godwin AK. Genetics and ovarian carcinoma. *Semin Oncol* 1998; 25: 265-80.
30. Couch FJ, Weber BL. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene: Breast Cancer Information Core. *Hum Mutat* 1996; 8: 8-18.
31. Khoo US, Chan KY, Cheung AN, Xue WC, Shen DH, Fung KY, et al. Recurrent BRCA1 and BRCA2 germline mutations in ovarian cancer: a founder mutation of BRCA1 identified in the Chinese population. *Hum Mutat* 2002; 19: 307-8.
32. Liede A, Malik IA, Aziz Z, Rios Pd Pde L, Kwan E, Narod SA. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 595-606.
33. Whittemore AS, Gong G, Itnyre J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast and ovarian cancer: Results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 496-504.
34. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002; 346: 1609-15.
35. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van'tVeer L, Garber JE, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002; 346: 1616-22.
36. Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, Labrie F, Skolnick MH, Goldgar DE, et al. Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 835-42.
37. Healey CS, Dunning AM, Teare MD, Chase D, Parker L, Burn J, et

- al. A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability. *Nat Genet* 2000; 26: 362-4.
38. Auranen A, Spurdle AB, Chen X, Lipscombe J, Purdie DM, Hopper JL, et al. BRCA2 Arg372His polymorphism and epithelial ovarian cancer risk. *Int J Cancer* 2003; 103: 427-30.
39. Wenham RM, Schildkraut JM, McLean K, Calingaert B, Bentley RC, Marks J, et al. Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4396-403.

= 국문초록 =

목적: 한국인에서 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자의 BRCA1 및 BRCA2의 배선 유전자 돌연변이를 확인하고 발생율을 구하여 이 자료를 향후 난소암 환자의 증상발현 전 진단에 활용할 수 있는지 조사하고 난소암 발생과 연관된 BRCA1 및 BRCA2 유전자의 다형성 (polymorphism)이 난소암 환자의 임상병리학적인 특징과 연관성이 있는지 살펴보고자 하였다.

연구 방법: 2002년 8월부터 2004년 3월까지 병기 결정을 위한 개복술을 시행 받고 병리학적으로 난소암을 확진 받았으며 가계도 분석에서 산발성 난소암으로 확인된 37명을 대상으로 말초 혈액을 채취하여 PCR-DHPLC-Sequencing method를 이용하여 BRCA1 및 BRCA2 유전자를 분석하였다.

결과: 1명의 난소암 환자에서 프레임 이동 (frame shift) 돌연변이가 발견되었다. 돌연변이는 BRCA1 유전자의 엑손 11K에 있는 코돈 1,218에서 3,746번째 염기에 adenine이 삽입 (insertion)되어 그 결과, 프레임이 이동하여 코돈 1,218에 정지 (stop) 코돈이 형성되어 절단 단백질 (truncated protein)을 생성하게 된다. 전체 환자 중 BRCA1 유전자 돌연변이율은 2.7%에 해당하였다. 37명의 난소암 환자의 BRCA2 유전자에서는 돌연변이가 발견되지 않았다. BRCA1 및 BRCA2 유전자형 분석 (genotyping)을 하는 중 얻어진 유전자다형성 중 rare allele frequency가 10% 이상인 다형성과 난소암의 임상병리학적인 특징과 비교하였으나 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보이는 결과는 없었다.

결론: 이상의 결과를 통하여 한국인에서 가족력과 무관하게 산발적으로 발생한 난소암 환자 37명에서 1명의 BRCA1 유전자 돌연변이를 확인하였으며 그 발생율은 2.7%이었다. 또한 난소암 감수성 유전자인 BRCA1 및 BRCA2 유전자 다형성과 난소암의 임상병리학적인 특징과는 관련성이 없어 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이는 한국인의 난소암 발생 (carcinogenesis)에 제한된 역할 (limited role)만을 한다고 사료된다.

중심단어: 산발성 난소암, 배선 돌연변이, BRCA1, BRCA2, Polymorphism
